

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

OTKA T 049077

Erdei fákon kórokozó *Phytophthora* fajok molekuláris azonosítása

Előzmények:

Előző OTKA projektünk során (T-037352) a *Phytophthora* fajok erdei fákon való magyarországi előfordulását és jelentőségét tártuk fel. Tüneteket mutató pusztuló fákat és erdőállományokat vizsgáltunk az ország különböző területein. Talaj- gyöker- és kéregmintákból speciális módszerekkel izoláltuk a kórokozókat. Közel 400 izolátumból álló törzsgyűjteményt hoztunk létre. Az izolátumokat morfológiai és élettani jellemzők alapján azonosítottuk. Ezek a módszerek azonban nem minden esetben vezetnek megbízható eredményre, elsősorban a jellegzetes morfológiai bélyegek elégtelensége miatt. Ezért, jelen projekt keretében a fajok pontos azonosítására molekuláris módszert alkalmaztunk.

A módszer kidolgozása:

A projekt első évében a módszer kidolgozásán munkálkodtunk. A szakirodalom alapján (Cooke and Duncan 1997) a riboszomális RNS-t kódoló gén (rDNS) ITS1 és ITS2 régióinak vizsgálatát tűztük ki célul. Kidolgoztuk a DNS kivonás és PCR amplifikáció eredményre vezető módszerét, amely több próbálkozást követően sikerült. Kipróbáltuk a PCR termék hasítását restrikciós enzimekkel és az ITS fragmentumok elektroforézisét, de ezzel a módszerrel a kiértékelés nehézkesnek, az eredmény megbízhatatlannak bizonyult. Ekkor a felszaporított ITS szakaszok nukleotid sorrendjének meghatározására térünk át, majd a szekvenciákat a GenBank adatbázisban meglevő ismert *Phytophthora* szekvenciákkal hasonlítottuk össze. Ez a módszer eredményre vezetett és a továbbiakban ezt alkalmaztuk.

A módszer részletes ismertetése:

A DNS-t tiszta tenyészetek micéliumából vontuk ki a REDExtract-N-Amp (Sigma-Aldrich) csomag felhasználásával, a gyártó cég útmutatásait követve. A PCR amplifikációt Eppendorf Mastercycler-rel végeztük az ITS4 és ITS6 indítószekvenciák alkalmazásával (Cooke and Duncan 1997). A PCR termék szekvenálása AB 3730XL automata szekvenáló készülékkel a bécsi University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU) közreműködésvel történt. A kapott szekvenciákat a GenBank adatbázisban levő ismert szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A kiegyenlítést ClustalX programmal, a statisztikai és filogenetikai elemzést Neighbour Joining (NJ) algoritmussal, Mega2 programcsomaggal, Tamura-Nei szubsztitúciós modellel végeztük (Cooke et al. 2000, Brasier et al. 2003, Garnica et al. 2006, Schena and Cooke, 2006). A projekt során a fenti módszereket sikerrel alkalmaztuk és számos izolátumunk faji azonosságát sikerült megállapítani.

A molekuláris vizsgálatba bevonandó izolátumokat az előzetes morfológiai vizsgálatok alapján választottuk ki olyan módon, hogy mindegyik morfológiai típus minden lelőhelyről és fafajról képviselve legyen. Így a DNS kivonást és PCR reakciót több mint 100 izolátum esetében végeztük el. Szekvenálásra alkalmas PCR terméket 80 izolátum esetében kaptunk, amelyek csaknem mindegyike esetében értékelhető szekvenciákat értünk el.

A molekuláris azonosítás eredményei:

Összesen hat *Phytophthora* fajt azonosítottunk és elkülönítettünk további 5 olyan haplotípust, amelyek még le nem írt fajokat, illetve taxonokat képviselnek. Az azonosított fajok gazdanövényeik, izolálásuk helye és ideje szerint a következők:

1. ábra: A hazai *Phytophthora* fajok (dőlt betűs) filogenetikai törzsfája

A *P. alni*-t először 1999-ben izoláltuk és morfológiai módszerekkel határoztuk meg éger fitoftóra fajhibridként (Brasier et al. 1995, Szabó et al. 2000). A molekuláris vizsgálat igazolta a morfológiai azonosítást, izolátumaink a *P. alni* subsp. *alni* alfaját képviselik és genetikailag teljesen azonosak (Lakatos és Szabó 2007).

A *P. cactorum*-ot először 2004-ben izoláltuk feketedió állományból (Szabó 2005). A morfológiai bélyegek is lehetővé tették az azonosítást, de a teljes bizonyosság érdekében a faji közléshez megvártuk a molekuláris vizsgálat eredményét is (Szabó és Lakatos 2007a). A megvizsgált négy izolátum ITS szekvenciái között minimális eltérést (1bp 0,16%) tapasztaltunk (Lakatos és Szabó 2007).

A *P. citricola*-t több gazdanövényről is izoláltuk, először égerről 2002-ben, majd feketedióról 2004-ben és tölgyekről 2005-ben. A feketedió esetében gyakori; a mesterséges fertőzések eredményei alapján kijelenthetjük, hogy jelentős szerepe van az állományok pusztulásában (Szabó 2005, Szabó és Lakatos 2006, 2007a, 2007b, 2007c). Ritkán a mézgás égeren is előfordult (Sopron, Fertőboz), továbbá pusztuló kocsányos tölgy és csertölgy egyedek gyökérzónájában is megtaláltuk (Sopron). Egyike azon fajoknak, amelyek morfológiai alapon is nagy biztonsággal azonosíthatók. A négy gazdáról származó 17 megvizsgált izolátum ITS szekvenciái a legnagyobb változatosságot mutatják, négy haplotípust képviselnek (11 bp, 1,44%). Egyik haplotípus közel áll a *P. inflata*-hoz (Lakatos és Szabó 2007).

A *P. gonapodyides*-t először 2003-ban izoláltuk *Alnus glutinosa*-n (Sopron, Csorna) és *Quercus petraea*-n (Sopron) fordult elő gyakran. A molekuláris azonosítás a legtöbb esetben igazolta a morfológiai azonosítást, de néhány olyan tölgyről származó izolátumunk is *P. gonapodyides*-nek bizonyult, amelyeket morfológiai alapon más fajnak feltételeztünk. A megvizsgált 11 izolátum mérsékelt genetikai változatosságot mutat (5 bp, 0,61 %).

A *P. inundata* az égeresek talajából egyik leggyakrabban izolált faj (Tornyosnémeti, Csorna). Először 2003-ban izoláltuk, faji leírása is abban az évben történt (Brasier et al. 2003). Morfológiai módszerrel csak azt állapíthattuk meg, hogy mely csoportba tartoznak az izolátumok, biztos azonosításuk molekuláris módszerrel lehetséges. A megvizsgált nyolc izolátum genetikai változatossága alacsony (1 bp).

A *P. megasperma* égeresekben fordult elő (Csorna, Keszthely), nem gyakori. Először 2003-ban izoláltuk, morfológiai alapon is azonosítottuk, de a teljes bizonyossághoz szükséges a molekuláris azonosítás eredménye is. A megvizsgált két izolátum genetikailag azonos.

Egyéb fajok/taxonok:

A molekuláris vizsgálatok során öt olyan haplotípus különült el, amelyek még le nem írt fajokat, taxonokat képviselnek, az azonos, vagy közeli GenBank-i tételek *Phytophthora* sp. néven szerepelnek. Valamennyi a filogenetikai törzsfa 6. ágához tartozik (Cooke et al. 2000) (1. ábra). Ezek az alábbiak:

Phytophthora sp. *hungarica* - égeresek talajából került elő 2003-ban és 2004-ben, nem gyakori. A két izolátum ITS szekvenciája azonos és alig különbözik a GenBank-ban található szekvenciáktól, pl. EF522143. A közeljövőben valószínűleg leírásra kerül.

Phytophthora sp. 1. - egyik leggyakoribb faj az égeresekben (Csorna, Hévíz, Kaszó), ritkán a feketediőn is előfordult (Homorud). A megvizsgált 18 izolátum ITS szekvenciája azonos, a *P. gonapodyides*-hez áll közel.

Phytophthora sp. 2., *P. sp. 3.*, *P. sp. 4.*

1-2 megvizsgált izolátumunk sorolható mindegyikhez, a filogenetikai törzsfa rendkívül komplex 6. ágához tartoznak, helyzetük, azonosságuk tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás:

Hat *Phytophthora* faj és 5 még le nem írt *Phytophthora* taxon molekuláris azonosítása történt meg erdei fákról Magyarországon. A fajok legnagyobb változatossága a mézgás éger állományokra jellemző, a feketediőről három, a tölgyekről két faj került elő mostanáig (1. táblázat). Öt elkülönített haplotípus vonatkozásában további vizsgálatok szükségesek, esetenként más DNS fragmentumok vizsgálatával kiegészítve.

1. táblázat: *Phytophthora* fajok előfordulása erdei fafajokon Magyarországon

	<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Juglans nigra</i>	<i>Quercus petraea</i>	<i>Quercus cerris</i>
<i>Phytophthora alni</i>	X			
<i>Phytophthora cactorum</i>		X		
<i>Phytophthora citricola</i>	X	X	X	X
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	X		X	
<i>Phytophthora inundata</i>	X			
<i>Phytophthora megasperma</i>	X			
<i>Phytophthora sp. hungarica</i>	X			
<i>Phytophthora</i> sp1	X	X		
<i>Phytophthora</i> sp2	X			
<i>Phytophthora</i> sp3	X			
<i>Phytophthora</i> sp4	X			
Összesen	10	3	2	1

A projekt futamideje során további izolálásokat végeztünk erdei fákról. Mintegy 100 új *Phytophthora* tenyészetünk van égerről, feketediőről, akácról. Azonosításuk részben megtörtént, részben folyamatban van.

Az eredmények jelentősége:

- új *Phytophthora* fajok feltárása erdei fákon Magyarországon
- új adatok a *Phytophthora* fajok elterjedéséhez és gazdanövényköréhez Európában
- a legkorszerűbb módszerek széleskörű alkalmazása a fajok azonosításában hazánkban
- az eredmények beépítése az Erdészeti növénykórtan és az Erdővédelemtan egyetemi tárgyak tananyagába
- pusztulási jelenségek pontos diagnózisa erdőállományokban,

Az eredmények publikálása:

A kutatási eredményeket a következő hazai és nemzetközi konferenciákon mutattuk, illetve mutatjuk be:

- 51. és 52. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2006 és 2007
- 4. Magyar Mikológiai Konferencia, Debrecen, 2008 május 29-31.
- XII IUFRO World Congress, Brisbane, Australia, 8-13 Aug. 2005.
- EVOLTREE Symposium, Philipps-University of Marburg 12-13 October 2006
- IUFRO WP. 7.02.02 Conference, Sopron, Hungary 21-26 May 2007,
- IUFRO WP. 7.02.09 Meeting, Monterey, California, USA, 26-31 Aug. 2007.
- XV. Congress of European Mycologists, Saint Petersburg, Russia, 16-21, Sept. 2007.
- 9th International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy, 24-29 Aug. 2008.

Az absztraktok és cikkek a konferencia kiadványokban megjelentek, illetve megjelenés alatt állnak. Előkészületben van két hazai (Növényvédelem, Erdészeti Lapok) és legalább egy külföldi (Forest pathology) folyóiratcikk.

A kutatás továbbfolytatása:

Az elért eredmények biztató távlatokat ígérnek a vizsgálatok eredményes folytatására, újabb *Phytophthora* fajok magyarországi előfordulásának és jelentőségének feltárására erdei fákon. Tekintettel e kórokozók növénykórtani, erdővédelmi jelentőségére, kutatásaink továbbfolytatását indokoltnak tartjuk és tervezzük a közeljövőben. További vizsgálatok szükségesek a 6. filogenetikai csoport pontosítására, továbbá egyes *P. citricola* izolátumok és a *P. inflata* kapcsolatának tisztázására is.

Irodalom:

Brasier, C. M., Rose, J., Gibbs, J. N. (1995): An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathol.* 44: 999-1007.

Brasier C. M.; Cooke, D. E. L.; Duncan, J. M.; Hansen E. M. (2003): Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* – *P. megasperma* ITS clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycol. Res.* 107(3): 277-290.

Brasier, C. M., Sanchez-Hernandez, E., Kirk, S. A. (2003): *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycol. Res.* 107 (4): 477-484.

Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D. E. L., Jung, T. (2004): *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycol. Res.* 108 (10): 1172-1184.

Cooke, D. E. L.; Duncan, J. M. (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 101, 667-677.

Cooke, D. E. L.; Drenth, A.; Duncan, J. M.; Wagels, G.; Brasier C. M. (2000): A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30, 17–32.

Garnica D. P.; Pinzon A. M.; Quesada-Ocampo L. M.; Bernal A.; Barreto E.; Grünwald N.; Restrepo S. (2006): Survey and analysis of microsatellites from transcript sequences in

Phytophthora species: frequency, distribution, and potential as markers for the phylum Oomycota. BMC Genomics 7, 245.

Lakatos F., Szabó I. (2007): *Phytophthora* species in forest trees in Hungary – a genetic approach. Proc. IUFRO 7.02.09 Meeting Monterey, USA, 26-31 Aug. 2007 (megjelenés alatt).

Schena, L.; Cooke, D. E. L. (2006): Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. J. of Microbiol. Methods 67, 70-85.

Szabó I. (2005): Role of *Phytophthora* spp. in decline of alder and black walnut stands. The Int. Forestry Review 7 (5): 393-393.

Szabó, I.; Nagy, Z.; Bakonyi, J.; T. Érsek, T. (2000): First Report of *Phytophthora* Root and Collar Rot of Alder in Hungary. Plant Disease 84 (11): 1251-1251.

Szabó I., Lakatos F. (2006): *Phytophthora* fajok jelentősége hazai erdőállományok pusztulásában. 52. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest 2006. febr. 23-24, p. 50-50.

Szabó I., Lakatos F. (2007a): Erdei fák gyökérszónájából izolált *Phytophthora* fajok molekuláris azonosításának első eredményei. 53. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2007. febr. 20-21. p. 82-82.

Szabó, I., Lakatos, F. (2007b): Occurrence and impact of *Phytophthora* species in forest trees in Hungary. Proc. IUFRO 7.02.09 Meeting Monterey, USA, 26-31 Aug. 2007 (megjelenés alatt).

Szabó I., Lakatos F. (2007c): *Phytophthora* species community in the rhizosphere of forest trees in Hungary. Proc. XV Congress of European Mycologists, Saint Petersburg, Russia, September 16-21, 2007, p. 266-266.

Szabó I., Lakatos F. (2007d): *Phytophthora* species in forest stands in Hungary. Acta Silvatica et Lignaria Hungarica Spec Vol. 2007, Proc. IUFRO WP. 7.02.02 conference 21-26 May 2007, Sopron, Hungary (megjelenés alatt).

Szabó I., Lakatos F. (2008): First data of isolation and identification of *Phytophthora* species in forest trees in Hungary. Acta Microbiol. Hung. (megjelenés alatt).